

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

小林 悟

(岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 教授)

「生殖細胞の形成機構の解明とその哺乳動物への応用」

1. 研究実施の概要

本研究は、ショウジョウバエおよびマウスの生殖細胞に関わる分子の同定および機能解析を行い、無脊椎、脊椎動物に共通する生殖細胞形成機構を明らかにすることを目的としている。

ショウジョウバエの生殖細胞は、初期胚の後極に形成される極細胞と呼ばれる細胞に由来することが知られている。形成された極細胞は生殖巣に取り込まれ、成虫まで発生した段階で生殖巣の中で卵や精子に分化する。これらの発生過程は、卵の後端に存在する生殖質（極細胞質）中に局在する複数の因子の働きにより制御されていることが明らかになっている。これまでに、極細胞の形成に関わる分子としてミトコンドリアのrRNA（mtrRNA）が、極細胞が生殖巣に移動する過程において機能する分子としてNanosタンパク質を同定した。現在までの研究により、これらの分子に関して以下の点が明らかになった。1) 極細胞質中でミトコンドリア外に搬出されたmtrRNAは、極顆粒と呼ばれる構造物上でミトコンドリア・タイプのリボソームを形成し、極細胞形成に関わるタンパク質の合成に関わることが明らかとなった。2) Nanosタンパク質が極細胞の細胞死（apoptosis）や体細胞に分化する経路を阻害することにより、極細胞を正常に生殖巣まで移動させ生殖細胞に分化させる働きがあることが明らかとなった。この結果は、ショウジョウバエの極細胞が潜在的には分化多能性であり、Nanosによりその運命が生殖細胞に分化するべく限局されることを示唆しており、今まで全く予想されていなかったものである。

以上の分子の他に、生殖細胞としての特質を決定する分子、すなわち「生殖細胞決定因子」が存在すると予想される。この分子は、おそらく生殖系列特異的な遺伝子発現を極細胞中で活性化する事によりこの機能を果たしていると考えられる。現在までに、この分子をコードする遺伝子の候補を同定することに成功している。また、生殖細胞中で特異的に発現する遺伝子を網羅することも試みている。これにより生殖細胞決定に関わる遺伝的経路が明らかになるものと期待している。

さらに、ショウジョウバエで明らかになっている生殖細胞形成に関わる遺伝子のホモログをマウスで単離し、その機能解析も行っている。現在までに、ショウジョウバエのnanos遺伝子のホモログをマウスで3種類単離した。そのうちnanos3は、移動期の始原生

殖細胞特異的に発現し、その機能を欠くノックアウトマウスでは移動期の始原生殖細胞に顕著な影響が見られる。この結果は、ショウジョウバエとマウスの生殖細胞形成過程の初期段階で同じ遺伝子が使われている初めての例であり、両動物に共通する生殖細胞形成機構を解明する上で特に重要な結果である。これと並行して、マウスにおける生殖細胞形成機構の解析も行っている。

2. 研究実施内容

研究1：極細胞形成機構の解明

現在までの研究において、ミトコンドリアの2種類のrRNAが極顆粒上に存在し、それらがミトコンドリアのリボソームタンパク質とともに、ミトコンドリアタイプのリボソームを形成していることが明らかとなった。このリボソームにより極細胞形成に関わるタンパク質をコードするmRNAが翻訳されると考えている。このmRNAの候補として、germ cell-less mRNAをあげることができる。このmRNAは、極細胞形成に関わるタンパク質をコードしており、その翻訳の開始時期は極顆粒上にミトコンドリアタイプのリボソームが形成される時期とほぼ一致する。現在までに、1) このmRNAが極顆粒上のポリソーム中に存在することを電子顕微鏡レベルの*in situ* ハイブリダイゼーション法で明らかにした。2) また、このミトコンドリア・タイプのリボソームによる翻訳が極細胞の形成に必須であるか否かを調べるために、ミトコンドリアのリボソームによる翻訳の阻害剤を胚にインジェクションした結果、極細胞形成が阻害されることを示唆する予備的な結果が得られた

研究2：極細胞内でおこる遺伝子発現抑制機構

現在までに、Nanosタンパク質が、本来体細胞で発現し体細胞の分化過程に関わる遺伝子の発現を抑制することにより、極細胞の移動過程を正常に進行させることを明らかにした。さらに、この機能に加え、Nanosタンパク質は、極細胞の細胞死(apoptosis)を抑制していることが明らかになった。Nanosタンパク質を欠き、かつ細胞死に必須な遺伝子を含む染色体領域(H99)をも欠く極細胞(nos-H99極細胞)の発生運命を追跡したところ、一部の極細胞が中腸やその付属器官さらに気管などを構成する体細胞に分化することを示唆する結果が得られた。この結果は、ショウジョウバエの極細胞が潜在的には分化多能性であり、Nanosによりその運命が生殖細胞に分化するべく限局されていくことを示唆している。同様の過程は、哺乳動物も含めいくつかの動物群で観察されており、この研究を皮切りに、この運命決定機構が明らかになる可能性がある。当初、Nanosタンパク質のこのような機能は明らかになっていなかったため、研究計画には含まれていなかったが、今後のこのNanosタンパク質の機能に関して研究を継続する予定である。

研究3：生殖細胞の特質を決定する機構

1) 本研究では、生殖細胞の分化の引き金を引くinstructiveな働きをする母性因子を単離・同定することを試みている。現在までに、突然変異を用いた遺伝学的な解析から、極細胞質に存在し極細胞に取り込まれ、極細胞中で自律的に働き減数分裂を制御する母性因子が存在することを示唆する結果を得ている。この因子をコードする遺伝子の

染色体上の位置を決定し、その領域に含まれる遺伝子群から候補遺伝子を同定している。今後は、引き続きに候補遺伝子が、上記の因子をコードしているか否かを明らかにしていく予定である。

2) 生殖細胞の分化の引き金を引く instructive な働きをする母性因子は、極細胞内で生殖系列特異的な遺伝子発現を引き起こすと考えられている。そこで、生殖巣に取り込まれた極細胞中で発現する遺伝子を網羅することを行っている。単離した生殖巣から cDNA ライブラリーを作成し、EST 解析及び *in situ* ハイブリダイゼーションによる分布解析を行ってきた。その結果、極細胞を含む生殖巣では少なくとも 2000 種類の遺伝子が発現しており、そのうち生殖巣特異的に発現するものが 22 種類、生殖巣と限られた体細胞器官でのみ発現するものが 45 種類同定できた。今後、これらの機能解析も行う予定である。

研究 4 : ショウジョウバエの生殖細胞形成因子の機能の普遍性の検討

1) ショウジョウバエにおいて生殖細胞の分化過程に必須な遺伝子 *nanos* のマウスホモログを 3 つ単離することに成功し、その機能解析を進めてきた。そのうち *nanos1* は神経系に非常に強い発現を示し、ノックアウトマウスにおける生殖細胞の形成に影響はみられなかった。一方、*nanos2* 及び *nanos3* は生殖細胞特異的に発現している。Nanos2 は胎生 13.5-15.5 日精巣において生殖細胞特異的に発現しており、そのノックアウトマウスは、その発現を反映し、雄に特異的な異常がみられた。生体の雄の精巣は矮小化しており、生殖細胞が完全に欠損していた。この生殖細胞の欠損は細胞死によることが確認された。しかし発現のない雌において卵巣は正常で生殖細胞にも異常がなかった。一方、*nanos3* は移動期の始原生殖細胞において発現しており、生殖巣に到達した後に雌では発現が次第に低下し、胎齢 13.5 日で完全に消失する。一方、雄では生殖巣に入ったあとも生殖細胞系列に発現し、胎齢 15.5 日頃にいったん消失するが、生後精原細胞において再び発現する。Nanos3 ノックアウトマウスは、ホモ変異マウスにおいて *nanos2* ノックアウトマウス同様に精巣が矮小化しているのに加えて、雌の卵巣の矮小化がみられた。組織学的解析を行った結果、雌雄ともに生殖細胞を完全に欠損していることが確認された。胎仔期の生殖細胞の発生過程を組織化学的に解析したところ、ホモ変異マウスでは、胎齢 7.5 日において野生型及びヘテロ変異マウスと同様に十数個のアルカリ性フォスファターゼ活性陽性細胞として始原生殖細胞が出現し、生殖細胞の決定には異常がないことが示された。しかし、その後、生殖細胞の移動期である胎齢 9.5 日から胎齢 10.5 日にかけて、生殖細胞の数が減少し生殖巣に到達したわずかな生殖細胞もその後まもなく消失することが示された。このように、移動期の始原生殖細胞特異的に発現し、ノックアウトマウスにおいて移動期の始原生殖細胞に顕著な影響を与える遺伝子は他に報告されていない。以上の結果から、マウス *nanos3* は始原生殖細胞の増殖或いは生存の維持に非常に重要な機能を果たしていると推測される。また、*nanos2* 及び *nanos3* ノックアウトマウスはヒトの不妊・生殖細胞欠損のモデルマウスとしても有用であることは明らかである。

2-a) 形成期始原生殖細胞で特異的に発現する遺伝子として*mil-1*を同定することに成功した。多能性幹細胞集団であるエピブラストから始原生殖細胞の発生運命決定が起こる際に、より上位で働く分子カスケードを同定することを目的に、*mil-1*の始原生殖細胞での特異的な発現機構を調べた。そのために、遺伝子の近傍領域をGFPにつないでトランスジェニックマウスを作ったところ、GFPの発現が形成期始原生殖細胞で特異的に見られることが明らかになった。今後、形成期始原生殖細胞の発現制御に関わるcis配列および、そこに作用する転写因子を同定し、さらにその始原生殖細胞形成における機能を今後明らかにする。

2-b) これまでに確立した、エピブラストからの始原生殖細胞形成を再現できる初代培養系を利用して、まず、形成期の始原生殖細胞が胚内のどこに存在するかを調べた。その結果、6.5日胚ではエピブラスト基部断片から始原生殖細胞形成が見られたが、6.75日胚ではその部分からは分化せず、一方、胚体外中胚葉からは分化が見られた。このことから、6.75日胚では、始原生殖細胞の前駆細胞は胚体外中胚葉に局在していることが明らかとなった。次に、胚体外中胚葉から始原生殖細胞が形成される過程を観察する目的で、前駆細胞から強いGFPの発現が見られるOct4 (GOF18 deltaPE) GFPトランスジェニックマウスの6.75日胚の胚体外中胚葉断片を培養し、タイムラプス解析でGFPを発現する細胞の挙動を観察した。その結果GFP強陽性細胞は、培養開始後しばらくは細胞塊を形成し、その後、活発に移動する始原生殖細胞が分化した。このことから発生運命の決定時に、始原生殖細胞の前駆細胞が細胞塊を作り相互作用をすることが重要であることが考えられた。そこで次に6.75日胚の胚体外中胚葉の細胞を解離して培養したところ、始原生殖細胞の形成は全くみられなかったが、この時期以降ではみられ、前駆細胞の細胞間相互作用が重要であることが示された。さらに細胞接着分子E-cadherinの発現が胚体外中胚葉でみられ、その阻害抗体を培養系に添加すると始原生殖細胞形成が阻害されたことから、E-cadherinを介した細胞間相互作用が始原生殖細胞への発生運命決定に必要であることが明らかになった。今後、ショウジョウバエにおいても、同様の現象が観察されるか検討すべき点と考える。

3. 研究実施体制

小林グループ

① 研究分担グループ長：小林悟（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター・教授）

② 研究項目：

ショウジョウバエにおける生殖細胞形成機構の解明に関する研究を行った。

上記研究実施内容の研究1～3に相当。

相賀グループ

① 研究分担グループ長：相賀裕美子（国立遺伝学研究所系統生物研究センター・教授）

② 研究項目：

上記研究実施内容の研究4のうち、1)を実施した。

松居グループ

① 研究分担グループ長：松居靖久（大阪府立母子保健総合医療センター研究所・部長）

② 研究項目：

上記研究実施内容の研究4のうち、2)を実施した。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

○ H. Sano, A. Nakamura, and S. Kobayashi

Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*.

Mech. Dev. 112, 129-139. (2002)

○ M. Yamamoto, and Y. Matsui

Testis-specific expression of a novel mouse defensin-like gene, Tdl.

Mech. Dev. 116, 217-221 (2002)

○ Y. Nakamura, M. Yamamoto, and Y. Matsui

Introduction and expression of foreign genes in cultured embryonic gonads.

Reprod. Fertil. Dev. 14, 259-265 (2002)

○ K. Hayashi, T. Kobayashi, R. Goitsuka, Y. Matsui, and D. Kitamura

Smad1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast.

Mech. Dev. 119, 99-109 (2002)

○ S. Sato, T. Yoshimizu, E. Sato, and Y. Matsui

Erasure of methylation imprinting of *Igf2r* during mouse primordial germ-cell development.

Mol. Reprod. Dev. 65, 41-50 (2002)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）